

高等医药院校基础医学实验教学规划教材

医学生物化学与分子生物学 实训指导

主编 唐 微 朱名安



科学出版社

高等医药院校基础医学实验教学规划教材

医学生物化学与分子生物学 实训指导

主 编 唐 微 朱名安

副主编 李 珊 陈宗运

编 委 (按姓氏笔画排序)

王晓燕 朱名安 刘 莹

李 珊 李 强 余贤军

沈 力 陈宗运 唐 微

科学出版社

北 京

内 容 简 介

全书分为三篇。第一篇为常用实验技术,包括分光光度技术、色谱技术、电泳技术、离心技术、蛋白质的分离与纯化、基因工程技术。第二篇为生物化学实验,第三篇为分子生物学实验。其中生物化学实验根据难度和要求,分为基础实验、提高型实验、综合型实验和研究创新型实验四个层次。基础实验有蛋白质含量的测定等,提高型实验有血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳等,综合型实验有血清白蛋白和球蛋白的盐析分离及总蛋白的测定,研究创新型实验有肝糖原的提取与鉴定等。此外,本书附录附有实验室常用数据,如不同动物血糖正常值等实验数据。

本书可供各医学院校临床、麻醉、口腔、影像、检验、药学、护理等专业本科生实验教学使用,亦可作为相关科技工作者的工作参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

医学生物化学与分子生物学实训指导 / 唐微, 朱名安主编. — 北京: 科学出版社, 2018.7

高等医药院校基础医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-057934-8

I. ①医… II. ①唐… ②朱… III. ①医用化学-生物化学-医学院校-教学参考资料 ②医药学-分子生物学-医学院校-教学参考资料
IV. ①Q5 ②Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 131156 号

责任编辑: 周 园 / 责任校对: 郭瑞芝

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 陈 敬

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京市密东印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018 年 7 月第 一 版 开本: 787 × 1092 1/16

2018 年 7 月第一次印刷 印张: 7

字数: 159 000

定价: 28.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

高等医药院校基础医学实验教学规划教材

编写指导委员会

主 任	李 和				
副 主 任	李 涛	严世荣			
委 员	(按姓氏笔画排序)				
	付 勇	朱名安	阮绪芝	严世荣	李 和
	李 涛	李文春	杨 虹	金志雄	赵万红
	郭 阳	郭怀兰	唐 微	彭吉林	曾凡龙
丛书主编	李文春	阮绪芝	朱名安		
丛书副主编	金志雄	赵万红	郭 阳		
编 委	(按姓氏笔画排序)				
	丁演鹂	卫荣华	卢 敏	付 勇	朱名安
	阮绪芝	李 珊	李 琛	李文春	杨 虹
	杨 靖	余贤军	邵 鑫	金志雄	赵俊杰
	郝雪艳	姚淞元	郭 阳	郭怀兰	唐 杰
	唐 微	黄正亮	彭吉林	曾凡龙	

总 序

随着现代生命科学及其各种实验技术的飞速发展和高校教学模式的改革,现代高等医学教育更加强调培养学生的探索精神、科学思维、实践能力和创新能力。这就要求从根本上改变实验教学依附于理论教学的传统观念,要从人才培养体系的整体出发,建立以能力培养为主线,分层次、多模块、相互衔接的科学实验教学体系,使实验教学与理论教学既有机结合又相对独立。同时,必须加大对实验项目、实验条件、实验教学体系的改革力度,改革传统的以教研室为单位的教学实验室模式,整合完善现代医学实验室功能和管理,从而提高医学实验教学质量。

本系列实验教材由湖北医药学院组织编写,共9册,包括《人体解剖学实训指导》《系统解剖学实训指导》《局部解剖学实训指导》《医学显微形态学实训指导》《医学微生物学实训指导》《医学免疫学实训指导》《医学生物化学与分子生物学实训指导》《医学生物学实训指导》《预防医学实训指导》。系统介绍了系统解剖学、局部解剖学、组织胚胎学、医学微生物学、医学免疫学、生物化学与分子生物学、医学细胞生物学和医学遗传学、预防医学的实验研究所必需的知识与技术。此套教材编写工作是按照建设国家实验教学示范中心要求的实验教学模式,借鉴国内外同类实验教材的编写方法,力求做到体系创新、理念创新及制作精美。内容上将基础医学实验教学按照基础医学实验体系进行重组和有机融合,按照实验教学逻辑和规律,将实验内容按模块层次进行编写,基本上包括:①实验操作及常用仪器使用;②基本实验或经典验证性实验;③综合性实验;④研究创新性实验;⑤习题。不同层次学生可按照本专业培养特点和要求,对不同板块的必选实验项目和自选实验项目进行适当取舍。

其基本理念和设计思路具有以下特点:

1. 明确目标,准确定位 本系列实验教材编写过程中增加了临床应用多、意义较大的实验内容,适当选编新的内容,力求突出基础医学知识在医学相关专业临床工作中的应用。

2. 突出能力,结合专业 以“自主学习能力、临床执业能力”培养为根本,将各学科的相关知识与临床实践应用“链接”为一体,增强学生学习兴趣,突出应用能力培养,提高学生自主学习能力和学习效果。教材重视生命科学研究中如何发挥学生观察、分析与思辨能力的培养,主要任务是使大学生通过动手,得到实验技术的基本操作技能训练、科学思维和创新能力的培养,同时也要使他们初步了解或掌握先进技术和方法,与迅速发展的学科前沿接轨。

3. 增减内容,突出重点 本系列实验教材在编写过程中,坚持基本理论和基本知识以“必须、实用、够用”的原则。实验内容去旧增新,删繁就简。将原来一些经典实验与现代科学思维相结合,适当压缩,并进行内容和教学方法的改革。对原书的插图进行了精选。对所开设的每一个实验要求达到的培养目标作了清晰而明确的阐述。

4. 整体优化,彰显特色 教材在整体结构上,既考虑到教与学的传统习惯,力求整体上系统化,又考虑到教材内容的创新,体现教材的思想性和先进性;在教材内容的编写上突出专业特色,体现专业特点,强化知识应用,部分教材增加实验流程图以及实验要点和实验结果图,使规划教材具有更广泛的适应性;在结构及内容编排上条理清楚,层次分明,充分体现规范化特点。为扩大学生的知识面,启发其思维,根据每个部分的内容在临床工作中的应用情况,精选与临床密切相关的学科知识和有应用前景的新进展和新技术,将各相关学科有机结合在一

起，具有基础扎实、应用性强、科研创新性突出的优势。

本规划教材的使用对象以本科临床医学专业为主，兼顾预防、麻醉、口腔、影像、药学、检验、护理、康复、生物科学与生物技术、公共事业管理、信息管理与信息系统等专业需求，涵盖全部医学生的基础医学实验教学。

由于基础医学实验教学模式尚存在地区和校际间的差异，本规划教材可能存在偏颇之处，也会有不足和疏漏，敬请广大医学教育专家和同学提出宝贵意见，以便修订再版。

湖北医药学院

高等医药院校基础医学实验教学规划教材 编委会

2018年5月

前 言

生物化学是生命科学的基础学科,也是一门重要的实验性学科,其基础理论和技术手段已被广泛地应用于生命科学研究的各个领域。开展生物化学实验的目的是为了让医学生巩固和加深对生物化学基础理论的理解,掌握生物化学基本操作技术,培养基本的科研思维和实验数据的整理、分析能力,为其临床学习、毕业设计和将来的科学研究打下坚实的基础。

本实验教材分为三大部分,即常用实验技术、生物化学实验和分子生物学实验。此外,书后附有常用的实验数据,方便学生查询。常用实验技术简洁明了,通俗易懂,方便学生短时间内掌握实验技术的要旨。实验项目分为基本实验、提高型实验、综合型实验和研究创新型实验四个层次。基本实验以理论验证为主,锻炼学生的基本操作能力,加深学生对基础理论的正确理解,培养实事求是的科学精神。提高型实验在内容设计上不拘泥于单一学科知识领域,趋向于对学科间融合的探索。研究创新型实验旨在通过探索让学生更加有效地学习,以培养学生的综合能力和知识迁移能力。实验内容与理论教学有机结合,实验方法与实验条件相匹配,内容丰富而翔实。同一实验尽可能介绍多种常用的方法,便于教和学。

此外,一些实验项目后附有同步练习题。练习题主要以判断题、填空题和单选题为主,由此学生在完成实验的基础上,可以轻松地复习大课的内容,加深对理论知识的理解和巩固。

教材编写考虑了多层次教学的要求,可以满足医药院校各专业本科和专科人才培养目标的需要,也可供生命科学研究工作者参考使用。

教材编写过程中得到了我校基础医学院领导们的大力支持,在此一并表示诚挚的谢意!本教材可能会存有一些不足,由此给您使用带来的不便,恳请谅解并衷心希望您能给我们提出宝贵的意见和建议。

湖北医药学院 唐 徽

2018年5月7日

目 录

第一篇 常用实验技术	1
第一章 分光光度技术	1
第二章 色谱技术	4
第一节 色谱法的概念及特点	4
第二节 常用的色谱方法	5
第三章 电泳技术	10
第一节 基本原理	10
第二节 醋酸纤维素薄膜电泳	11
第三节 琼脂糖凝胶电泳	11
第四节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	13
第五节 染色方法	17
第四章 离心技术	19
第一节 离心理论	19
第二节 离心机操作要领	21
第五章 蛋白质的分离与纯化	22
第一节 蛋白质分离与纯化的原理及方法	22
第二节 蛋白质的浓缩、干燥和保存	23
第六章 酶学分析	25
第七章 基因工程技术	28
第一节 概述	28
第二节 聚合酶链反应扩增获取目的基因	28
第三节 基因载体的选择	29
第四节 基因工程常用的工具酶	30
第五节 重组体的构建	31
第六节 重组体导入受体细胞	31
第七节 重组子的筛选与鉴定	32
第二篇 生物化学实验	34
第八章 基本实验	34
实验一 蛋白质含量的测定	34
【同步练习题】	40
实验二 氨基酸的离子交换柱色谱分离	42
实验三 血红蛋白与核黄素的凝胶柱色谱分离	43
实验四 醋酸纤维薄膜电泳分离血清蛋白	44
实验五 动物组织中核酸的提取与鉴定	46
【同步练习题】	48

实验六 蛋白质的透析纯化	51
实验七 血清过氧化氢酶 K_m 值的测定	51
【同步练习题】	54
实验八 血糖含量的测定	56
实验九 胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响	59
【同步练习题】	60
实验十 血清三酰甘油 (TG) 含量的测定	63
【同步练习题】	66
实验十一 酮体的生成和利用	67
实验十二 血浆高密度脂蛋白-胆固醇 (HDL-Ch) 含量的测定	71
【同步练习题】	72
实验十三 血清谷丙转氨酶 (ALT) 活性的测定	73
【同步练习题】	75
第九章 提高型实验	76
实验十四 血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳	76
实验十五 琥珀酸脱氢酶的抑制作用	78
第十章 综合型实验	80
实验十六 血清白蛋白和球蛋白的盐析法分离、白/球比及总蛋白的测定	80
第十一章 研究创新型实验	82
实验十七 肝糖原的提取与鉴定	82
实验十八 不同组织 ALT 活性测定及温度、pH 的影响	82
附：“肝糖原的提取与鉴定”的原理和方法	83
第三篇 分子生物学实验	84
第十二章 分子生物学实验技术	84
实验十九 动物白细胞中 DNA 的提取 (碘化钠法)	84
实验二十 组织细胞总 RNA 的提取	85
实验二十一 核酸的凝胶电泳	86
方案一 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	89
方案二 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	90
实验二十二 DNA 为模板的聚合酶链式反应扩增	91
【同步练习题】	92
实验二十三 质粒 DNA 的提取 (碱变性裂解法)	93
【同步练习题】	94
实验二十四 大肠杆菌感受态细胞的制备与转化	95
实验二十五 载体与目的基因的连接	96
附录 实验室常用数据	97

第一篇 常用实验技术

第一章 分光光度技术

有色溶液对光线有选择性的吸收作用,不同物质由于其分子结构不同,对不同波长光线的吸收能力也不同,因此,每种物质都具有其特异的吸收光谱。有些无色溶液虽对可见光无吸收作用,但所含物质可以吸收特定波长的紫外线或红外线。从一个有连续光谱的光源,逐步地分出各个波长的光,使其透过含待测物的真溶液,测出其在不同波长时的光密度,然后以波长为横坐标,以光密度为纵坐标,就可以得到待测物的吸收光谱曲线,由此找出其中吸收最强的波长,作为灵敏光波长对该待测物进行定量测定。分光光度法主要是指利用物质特有的吸收光谱来鉴定物质性质及含量的技术,其理论依据是朗伯(Lambert)定律和比尔(Beer)定律。

一、光的基本知识

光是由光子组成的,具有二重性,即不连续的微粒性和连续的波动性。波长和频率是光的波动性的特征,可用下式表示:

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

式中, λ 为波长,具有相同的振动相位的相邻两点间的距离叫波长; ν 为频率,即每秒钟振动次数; c 为光速,等于(299 770±4) km/s。光属于电磁波。

自然界存在各种不同波长的电磁波(表 1-1)。分光光度法所使用的光谱范围在 200nm~10 μ m (1 μ m=1000nm)。其中 200~400nm 为紫外光区,400~760nm 为可见光区,760~10 000nm 为红外光区。

表 1-1 电磁波谱

区域	波长		来源
	以米(m)计量	常用单位	
γ 射线	$1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-3} \sim 0.1\text{nm}$	原子核
X射线	$1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-8}$	0.1~10nm	内层电子
远紫外	$1 \times 10^{-8} \sim 2 \times 10^{-7}$	10~200nm	中层电子
紫外光	$2 \times 10^{-7} \sim 4 \times 10^{-7}$	200~400nm	外层价电子
可见光	$4 \times 10^{-7} \sim 7.6 \times 10^{-7}$	400~760nm	外层价电子
红外光	$7.6 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-5}$	0.76~50 μ m	分子的振动与转动
远红外光	$5 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3}$	50~1000 μ m	分子的振动与转动
微波	1×10^{-3}	0.1~100cm	分子转动
无线电波	1×10^3	1~1000m	核磁共振

二、朗伯-比尔定律

朗伯-比尔 (Lambert-Beer) 定律是比色分析的基本原理, 这个定律讨论的是有色溶液对单色光的吸收程度与溶液的浓度及液层厚度之间的定量关系。

1. 朗伯定律 一束单色光通过溶液后, 由于溶液吸收了一部分光能, 光的强度就要减弱。若溶液浓度不变, 则溶液的厚度越大 (即光在溶液中所经过的路径越长), 光的强度减低越显著。

设光线通过溶液前的强度为 I_0 (入射光的强度), 通过液层厚为 L 的溶液后光的强度为 I_t (透射光的强度), 则 $\frac{I_0}{I_t}$ 表示透射光的强度是入射光强度的几分之几, 称为透光度 (transmittance), 用 T 表示。透光度随溶液厚度的增加而减少, 但实践证明, 透光度和溶液层厚度之间并不存在简单的定量关系, 只有透光度的负对数 ($-\lg T$) 才随着溶液厚度的增加而成正比例增加, 即

$$-\lg T = -\lg \frac{I_t}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I_t} \propto L$$

将上述比例写成等式, 得到 $\lg \frac{I_0}{I_t} = K_1 L$, 式中, $\lg \frac{I_0}{I_t}$ 称为吸光度 (absorbance, A), 或光密度 (optical density, D), 所以

$$A = K_1 L$$

式中, K_1 为比例系数, 其值取决于入射光的波长、溶液的性质和浓度, 以及溶液的温度等。上式表明, 当溶液的浓度不变时, 吸光度与溶液液层的厚度成正比, 这就是朗伯定律。

2. 比尔定律 当一束单色光通过有色溶液后, 溶液液层的厚度不变而浓度不同时, 溶液浓度越大, 则透射光的强度越弱, 其定量关系如下:

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = K_2 C \quad \text{即 } A = K_2 C$$

式中, C 为有色物质溶液的浓度, K_2 为比例系数, 其值取决于入射光的波长、溶液的性质和液层的厚度, 以及溶液的温度等。上式表明, 当溶液液层的厚度不变时, 吸光度与溶液的浓度成正比, 这就是比尔定律。

3. 朗伯-比尔定律 如果同时考虑吸收层的厚度和溶液浓度对光吸收的影响, 则必须将朗伯定律和比尔定律合并起来, 得

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = KLC \quad \text{即 } A = KLC$$

吸光度与溶液的浓度和液层的厚度的乘积成正比, 这就是朗伯-比尔定律。

在上式中, 若 L 用厘米 (cm) 表示, C 用克/升 (g/L) 表示, 则比例常数 K 称为吸光系数, 其值取决于入射的波长、溶液的性质和温度等, 而与光的强度、溶液的浓度及液层的厚度无关。

若 L 用厘米 (cm) 表示, C 用摩尔/升 (mol/L) 表示, 则上式中的比例常数用 ϵ 表示, 得

$$A = \epsilon LC$$

式中, ϵ 称为物质的摩尔吸光率 (molar absorptivity) 或摩尔吸光系数 (molar absorption coefficient)。

不同的物质可能会有相同的最大吸收波长, 但其摩尔吸光率不一定相同。 ϵ 值越大, 说明该物质溶液对光的吸收越强烈, 则比色测定的灵敏度越高。

三、分光光度技术的应用

1. 测定溶液中物质的含量 可见分光光度法或紫外分光光度法都可用于测定溶液中物质的含量。这需要测定标准溶液（浓度已知的溶液）和未知液（浓度待测定的溶液）的吸光度，将两者进行比较。由于所用比色皿的厚度是一样的，可用下式进行计算：

$$\frac{A_x}{A_s} = \frac{KC_xL}{KC_sL} = \frac{C_x}{C_s} \text{ 即 } C_x = \frac{A_x}{A_s} \times C_s$$

式中， C_x 代表未知液的浓度， C_s 代表标准液的浓度， A_x 和 A_s 分别代表未知液和标准液所测得的吸光度值。式中只有 C_x 是未知的，可由上式计算得之。也可以先测出不同浓度的标准液的吸光度，绘制标准曲线，在选定的浓度范围内标准曲线应该是一条直线，然后测定出未知液的吸光度，即可从标准曲线上查到其相对应的浓度。

含量测定时所用波长通常要选择被测物质的最大吸收波长，这样做有两个好处：一是灵敏度高，物质在含量上的稍许变化将引起较大的吸光度差异；二是可以避免其他物质的干扰。

还可利用摩尔吸光率（ ϵ ）求得测定物质的浓度，由于物质的 ϵ 是已知的，读取光径（液层厚度）为 1cm 时溶液的吸光度（ A ），则可计算溶液中物质的浓度（ C ）。

$$C = \frac{A}{\epsilon}$$

此式常在紫外光吸收法时应用，无需显色反应，操作方便。

2. 用紫外光谱鉴定化合物 使用分光光度计可以绘制吸收光谱曲线。方法是用各种波长不同的单色光分别通过某一浓度的溶液，测定此溶液对每一种单色光的吸光度，然后以波长为横坐标，以吸光度为纵坐标绘制吸光度-波长曲线，此曲线即吸收光谱曲线。

各种物质有其自己的吸收光谱曲线，因此用吸收光谱曲线图可以进行物质种类的鉴定。当一种未知物质的吸收光谱曲线和某一已知物质的吸收光谱曲线形状一样时，则它们很可能是同一物质。一定物质在不同浓度时，其吸收光谱曲线中峰值的大小不同，但形状相似，即吸收高峰和低谷的波长是一定不变的。

紫外光吸收是由不饱和的结构造成的，含有双键的化合物能表现出吸收峰。紫外光吸收光谱比较简单，同一种物质的紫外光吸收光谱应完全一致，但具有相同吸收光谱的化合物结构不一定相同。除了特殊情况外，单独依靠紫外光吸收光谱不能决定一个未知物的结构，必须与其他方法配合。因此，紫外吸收光谱分析主要用于已知物质的定量分析和纯度分析。

（李 珊）

第二章 色谱技术

第一节 色谱法的概念及特点

1903年,俄国科学家 M. C. Jber 首创了一种从绿叶中分离多种不同颜色色素成分的方法,命名为色谱法(chromatography)。20世纪50年代开始,相继出现了气相色谱、液相色谱、高效液相色谱、薄层色谱、离子交换色谱、凝胶色谱、亲和色谱等。

一、色谱法的概念

色谱法是利用混合物中各组分的理化性质的差异(吸附力、溶解度、分子形状和大小、分子极性、分子亲和力等),使各组分以不同程度分布在两个相中,其中一个相称为固定相(stationary phase),另一相流过此固定相称为流动相(mobile phase)。由于各组分受流动相作用产生的推力和受固定相作用产生的阻力不同,因而各组分的移动速度不同,这样,结构上只有微小差异的各组分才能得到分离。蛋白质纯化的许多技术,就是利用色谱法(表2-1)。

二、色谱法的特点

1. 具有极高的分辨效力 只要选择好适当的色谱法(色谱类型、色谱条件),就能很好地分离理化性质极为相近的混合物。

2. 具有极高的分析效率 对某一混合组分,只需几十分钟乃至几分钟就可完成一个分析周期。如用高效薄层色谱(high performance thin layer liquid chromatography, HPTLC)一次仅10分钟就可完成40个样品的点样和分析工作。

3. 具有极高的灵敏度 样品组分含量仅数微克,或不足1 μg 都可进行很好的分析。现代的气相色谱仪由于使用了高灵敏的检测器,可检出 $1 \times 10^{-13} \sim 1 \times 10^{-11}\text{g}$ 的样品组分。

4. 操作简便,应用广泛 它广泛地应用于工农业、化学、化工、医药卫生、环境保护、大气监测等各个方面,是现代实验室中常用的分析手段之一。

表 2-1 蛋白质的纯化技术

分离依据	分离方法 色谱类型	特点	用途
分子大小	凝胶过滤	分级分离,分辨率适中,适于脱盐分级分离时流速较慢(>8小时循环)的情况	大规模纯化的最后一步,用于去除微量杂质及聚合体脱盐,可用于任何阶段。
电荷	离子交换	分辨率通常较高,流速较快(合适的填料),容量很大,样品体积不受限	最适于早期纯化,即大体积样品及蛋白质纯度较低时使用
等电点	色谱聚焦	分辨率较高,流速快,容量很大,样品体积不受限	纯化最后阶段
疏水特性	疏水作用	分辨率较高,流速大,容量大,样品体积不受限	适于任何阶段,特别适用于离子强度较高时,如沉淀、离子交换和亲和层析后
	反相	分辨率较高,流速很快,容量大	适于最后阶段,特别适于相对分子质量较小的肽
生物亲和性	亲和	分辨率极高,流速大,容量大,体积不限	适于任何阶段,特别是样品浓度小,杂质含量多时使用

当然, 色谱法也有它的局限性: ①在定量分析中需要纯制的标准物质; ②不能精确地解决物质的化学结构问题。

第二节 常用的色谱方法

一、吸附色谱

吸附色谱 (absorption chromatography) 是指混合物随流动相通过由吸附剂组成的固定相时, 由于吸附剂对不同组分有不同的吸附力, 从而不同组分随流动相移动的速度不同, 最终可将混合物中不同组分分离的方法。这种分离方法取决于待分离物质被吸附剂固定相所吸附的能力, 以及它们在分离时所用的溶剂流动相中的溶解度这两个方面的差异。根据操作方式不同, 吸附色谱可分为柱色谱 (column chromatography) 和薄层色谱 (thin layer chromatography) 两种。

(一) 柱色谱

在柱吸附色谱中, 混合物的分离是在装有适当吸附剂的玻璃管柱中进行的, 色谱柱下端铺垫棉花或玻璃棉, 柱内充填溶剂湿润的吸附剂, 待分离样品自柱顶部加入, 样品完全进入吸附柱后, 再用适当的溶液 (洗脱液) 洗脱。假如待分离的样品内含有 A、B 两种成分, 在洗脱过程中随着流动相流经固定相, 它们在柱内分别连续地产生溶解、吸附、再溶解的现象。由于洗脱液和吸附剂对 A、B 的溶解力与吸附力不同, A、B 在柱内移动的速率也不同。溶解度大而吸附力小的物质走在前面, 相反, 溶解度小而吸附力大的物质走在后面。经过一段时间以后, A、B 两种物质可在柱的不同区域各自形成环带。如 A、B 为有色物质, 就可以看到不同的色层, 每个色带就是一种纯物质。然后继续用洗脱液洗脱, 分段收集, 直到各组分按顺序先后完全从柱中洗出为止。

(二) 薄层色谱

薄层色谱利用的方法是把吸附剂均匀地铺在玻璃板或塑料膜上形成薄层, 将待分离的样品点在薄层一端, 在密闭容器中用适宜的溶剂 (展开剂) 展开, 由于吸附剂对不同物质吸附力大小不同, 因此当溶剂流过时, 不同物质在吸附剂和溶剂之间发生连续不断地吸附、解吸附、再吸附、再解吸附, 易被吸附的物质相对移动较慢, 较难吸附的物质则相对地移动得快一些。经过一段时间的展开, 不同的物质就被彼此分开, 最后形成互相分离的斑点。

薄层色谱的特点是: ①灵敏度高, 可检出微量物质; ②分离能力强, 斑点集中; ③展开时间短; ④操作简便, 适于很多微量样品分离鉴定。

(三) 常用的吸附剂

色谱用吸附剂应满足两个要求: 一是要有较大的吸附表面和一定的吸附能力, 对不同的物质吸附力不同, 而且不能与被吸附的物质及洗脱液 (或展开剂) 发生反应; 二是吸附剂粒度大小适中, 不宜过粗 (展开太快, 分离效果差), 也不宜太细 (展开过慢, 斑点易于扩散)。一般来说, 薄层色谱所用吸附剂的粒度较细, 如硅胶要求 200 目左右。

常用的吸附剂有氧化铝、硅胶、聚酰胺等。

(四) 洗脱液 (展开剂)

不论是柱色谱还是薄层色谱, 在选择洗脱液或展开剂时应符合以下条件: ①一般应使用比较纯的试剂, 含有杂质常会影响洗脱能力; ②与样品、吸附剂不发生化学反应; ③能溶解样品中的各成分; ④黏度小、流动性好, 不致洗脱或展开太慢; ⑤容易与所要分离的成分分开。

选择色谱分离条件时，必须从吸附剂、洗脱液及被分离物质三方面考虑，一般用亲水性吸附剂（如硅胶、氧化铝）作色谱分离时，若被测组分极性较大，应选用吸附性较强（活动较低）的吸附剂，用极性较大的洗脱液或展开剂；若被测组分亲脂性较强，应选用较强（活动较高）的吸附剂及极性较小的洗脱液或展开剂。常用洗脱液或展开剂极性递增的次序是：石油醚 < 环己烯 < 四氯化碳 < 苯 < 甲苯 < 乙醚 < 氯仿 < 乙酸乙酯 < 正丁醇 < 丙酮 < 乙醇 < 甲醇 < 水。

二、分配色谱

分配色谱（partition chromatography）是利用混合物在两种或两种以上不同溶剂中的分配系数不同而使物质分离的方法，相当于一种连续性的溶剂抽提方法，如用带水的材料（载体）作为液相（固定相）加入与水不相混合或仅部分混合的溶剂（流动相），则混合物各组分在两相间发生不同的分配现象而逐渐分开，形成色层。

（一）原理

纸色谱是应用最广泛的一种分配色谱，以滤纸作为载体。滤纸纤维与水有较强的亲和力，能吸附 22% 左右的水，其中 6%~7% 的水以氢键形式与纤维素的羟基结合，在一般条件下较难脱去。而滤纸纤维与有机溶剂的亲和力很小，所以纸色谱是以滤纸的结合水为固定相，以有机溶剂为流动相。当流动相沿滤纸经过样品时，样品在水和有机溶剂这两种互不相溶的溶剂之间不断进行分配，不同的物质因其在各种溶剂中的溶解度不同，因而分配系数各异。分配系数较大的物质留在固定相中较多，而在流动相中较少，色谱过程中向前移动较慢；相反，分配系数较小的物质进入流动相较多，而在固定相中较少，色谱过程中向前移动就较快，样品经色谱后可用比移值 R_f 值来表示。

$$R_f = \frac{\text{原点至斑点中心的距离}}{\text{原点至溶剂前沿的距离}}$$

R_f 值取决于被分离物质在两相间的分配系数及两相的体积比。由于两相体积比在同一实验条件下是常数，所以 R_f 值主要决定于分配系数。不同物质分配系数不同， R_f 值也不同。对于某种给定的化合物而言，在标准条件下 R_f 是常数。

（二）色谱纸的选择与处理

1. 要求滤纸质地均匀，平整无折痕，边缘整齐，有一定的机械强度。
2. 纸纤维的松紧适宜，过于疏松易使斑点扩散，过于紧密则流速太慢。
3. 纸质要纯，杂质量要少。在选用滤纸型号时应结合分离对象加以考虑，对 R_f 值相差很小的混合物宜采用慢速滤纸，若选用快速滤纸则易造成区带重叠而分不开。

三、凝胶色谱

（一）原理

凝胶色谱（gel chromatography）是指混合物随流动相流经装有凝胶作为固定相的色谱柱时，混合物中各种物质因分子大小不同而被分离的技术。

凝胶色谱的机制是分子筛效应，如同过筛那样，它可以把物质按分子大小不同进行分离，但这种“过筛”与普通的过筛不一样，凝胶色谱柱中装填的是许多直径小于 1mm 的凝胶颗粒，

凝胶颗粒内部是由三维多孔网状结构构成的。在洗脱过程中,当含有分子大小不一的混合物样品加到凝胶床面后,大分子物质因其分子直径大于凝胶网孔而不能进入凝胶颗粒内部,只能沿着凝胶颗粒的空隙随溶剂流动,受到的阻滞作用小,流程短而移动速度快,先流出色谱柱;但分子量小的组分则由于其分子直径小于网状结构的孔径而进入凝胶颗粒内部,受到网孔的阻滞作用,流程长而移动速度慢,比大分子物质后流出色谱柱,从而使分子大小不同的混合物得到分离。

(二) 凝胶

凝胶是由胶体溶液凝结而成的固体颗粒状物质,其内部是微细的多孔网状结构。目前市场上供应的色谱用凝胶主要有交联葡聚糖凝胶、交联聚丙烯酰胺凝胶及琼脂糖凝胶等。

1. 交联葡聚糖凝胶 瑞典生产的商品名称为 Sephadex, 国产商品名称为 Dextran, 它是由葡聚糖(右旋糖苷)和甘油通过醚桥($\text{—O—CH}_2\text{—CHOH—CH}_2\text{—O—}$)相交联而成的多孔性网状结构,制备葡聚糖凝胶所用的交联剂为 3-氯-1, 2-环氧丙烷。由于交联度的不同, Sephadex 颗粒孔隙大小也不同,按交联程度大小, Sephadex 可以分成不同的型号,交联度大的孔隙小,吸水少,膨胀也少,适用于小分子物质的分离;交联度小的孔隙大,吸水多,膨胀也大,适用于大分子物质的分离。交联度可用“吸水量”表示,即每克干凝胶所吸收的水分重量,用这个量比较交联度的大小。商品凝胶的型号采用“吸水量”(水容值)的 10 倍数字来表示。例如,每克凝胶吸水量为 2.5g 即定为 G-25 型。具体葡聚糖凝胶的技术数据见表 2-2。

表 2-2 葡聚糖凝胶(G)类的技术数据

型号	分离范围(分子量)		吸水量/ 干凝胶(g/g)	膨胀体积/ 干凝胶(ml/g)	浸泡时间(小时)	
	蛋白质	多糖			20~25℃	90~100℃
G-10	≤700	≤700	1.0±0.1	2.0~3.0	3	1
G-15	≤1500	≤1500	1.2±0.2	2.5~3.5	3	1
G-25	1000~5000	100~5000	2.5±0.2	4.0~6.0	3	1
G-50	1500~30 000	500~10 000	5.0±0.3	9.0~11	3	1
G-75	3000~70 000	1000~50 000	7.5±0.5	12~15	24	3
G-100	4000~150 000	1000~100 000	10±1.0	15~20	72	5
G-150	5000~400 000	1000~150 000	15±1.5	20~30	72	5
G-200	5000~800 000	1000~200 000	20±2.0	30~40	72	5

2. 聚丙烯酰胺凝胶 是一种人工合成的凝胶,美国生产的商品名称为生物胶 P(Bio-gel P),产品为颗粒状,在溶剂中能自动吸水溶胀成凝胶。聚丙烯酰胺的组成单位是丙烯酰胺($\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$),加热使其相互聚合成线性多聚物,再与甲叉双丙烯酰胺($\text{CH}_2=\text{CHCONHCH}_2\text{NHCOCH}=\text{CH}_2$)共聚生成交联的聚丙烯酰胺,经干燥粉碎或加压成形处理即成生物凝胶 P。控制单体和交联剂的比例可得到不同型号的生物凝胶 P。Bio-gel P 有 P-2-P-300 等 10 种,命名是根据分子量的近似排斥限度。所谓排斥限度是指凝胶能将物质排斥在其颗粒外的分子大小的最低限度,以分子量表示。例如, Bio-gel P-6,其排斥限度分子量为 6×10^3 。各种型号的生物胶及其适用范围列于表 2-3。

表 2-3 丙烯酰胺类凝胶和琼脂糖类凝胶的技术数据

型号	吸水量 g/g 干胶	膨胀体积 ml/g 干胶	浸泡时间 (小时)		分离范围 (球形分子的分子量)
			20℃	100℃	
Bio-gel					
P-2	1.5	3.0	4	2	$2 \times 10^2 \sim 1.8 \times 10^3$
P-4	2.4	4.8	4	2	$8 \times 10^2 \sim 4 \times 10^3$
P-6	3.7	7.4	4	2	$1 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3$
P-10	4.5	9.0	4	2	$1.5 \times 10^3 \sim 2.0 \times 10^4$
P-30	5.7	11.4	12	3	$2.5 \times 10^3 \sim 4.0 \times 10^4$
P-60	7.2	14.4	12	3	$3.0 \times 10^3 \sim 6.0 \times 10^4$
P-100	7.5	15.0	24	5	$5.0 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$
P-150	9.2	18.4	24	5	$1.5 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^5$
P-200	14.7	29.4	48	5	$3.0 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$
P-300	18.0	36.0	48	5	$6.0 \times 10^4 \sim 4 \times 10^5$

3. 琼脂糖凝胶 是 *D*-半乳糖和 3, 6-(脱水)-2-半乳糖相间结合的链状多糖, 瑞典生产的商品名称为 Sepharose, 此产品通常有 2B 和 4B 两种, 分别代表含琼脂糖凝胶 2% 和 4% 的凝胶, 凝胶浓度越低其结构越松散, 即多孔性越高。由于以上这些优点, 它的应用受到人们的重视。琼脂糖凝胶的商品名为 Sepharose 或 Bio-gel A。

四、离子交换色谱

1. 基本原理 离子交换色谱 (ion exchange chromatography, IEC) 是目前在生物大分子提纯中得到最广泛应用的方法之一。它是利用不同生物大分子的带电部分与具有相反电荷的离子交换剂吸附强弱不同的原理, 因此所需的洗脱剂强度不同。

离子交换剂是借酯化、氧化或醚化等化学反应, 在琼脂糖、纤维素或凝胶分子上引入阳离子或阴离子基团的特殊剂型。当离子交换剂带阳离子基团时, 可吸附阴离子样品, 称为阴离子交换剂, 如二乙氨乙基 (DEAE)。反之, 离子交换剂带阴离子基团时, 可吸附阳离子样品, 称之为阳离子交换剂, 如甲基纤维素 (CM)。

离子交换剂分离样品时, 主要依靠增加缓冲溶液的离子强度或改变酸碱度来进行洗脱。增加缓冲溶液的离子强度: 当缓冲溶液的离子强度增加时, 即增加了它与生物大分子对交换基团竞争吸附的能力, 把生物大分子置换下来。改变酸碱度: 当缓冲溶液的 pH 接近生物大分子的等电点时, 其净电荷为零, 从而可被洗脱。由于不同生物大分子的电荷密度分布不同、电荷量不等、等电点的差异及分子大小的区别, 因而与离子交换剂的结合强度不同, 利用一定的置换条件, 可将其逐一分开。

2. 离子交换剂的类型 主要有带离子交换基团的琼脂糖、葡聚糖及纤维素三类, 三者各有优缺点, 现分述如下。

(1) 琼脂糖类: 这类离子交换填料是在琼脂糖表面进行化学改造而制备的。由于琼脂糖表面含有大量的羟基, 化学改造极为方便。目前琼脂糖系列的离子交换填料在生物大分子的分离中占据了绝对优势的地位。